

(19)日本国特許庁 (J P) (12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号
特許第3329819号
(P3329819)

(45)発行日 平成14年9月30日(2002.9.30) (24)発出日 平成14年7月19日(2002.7.19)

(51)IntCl. ⁷	分類記号	P 1
C 12 N 15/09	ZNA	A 01 H 1/00
A 01 H 1/00		C 12 N 15/00
C 12 N 5/10		ZNAA
		C

請求項の数34(全 22 頁)

(21)出願番号	特願平7-50837	(73)特許権者	89999999 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号
(86) (22)出願日	平成6年9月1日(1994.9.1)	(72)発明者	吉藤 秀孝 静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社宣伝育成研究所内
(86) 国際出願番号	PCT/J94/01442	(72)発明者	石田 祐二 静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社宣伝育成研究所内
(87) 国際公開番号	WO95/06722	(72)発明者	徳江井 新弘 静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社宣伝育成研究所内
(87) 国際公開日	平成7年3月9日(1995.3.9)	(72)発明者	小崎 敏彦 静岡県静岡市駿河区東原700 日本たばこ産業株式会社宣伝育成研究所内
(31)優先権主張番号	特願平5-26375	(74)代理人	99999999 弁理士 谷川 英太郎
(32)優先日	平成5年9月3日(1993.9.3)		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		
(32)優先日	特願平6-27230		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54) [発明の名称] 未熟胚の胚盤を用いた種子繁殖体の形質転換方法

(57) [特許請求の範囲]
【請求項1】 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌の脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項2】 アグロバクテリウム属細菌で種子繁殖体の脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項3】 アグロバクテリウム属細菌で種子繁殖体の脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項4】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項5】 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で種子繁殖体の脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項6】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項7】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項8】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項9】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項10】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項11】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項12】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項13】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項14】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項15】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項16】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項17】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項18】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項19】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項20】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項21】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項22】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項23】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項24】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項25】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項26】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項27】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項28】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項29】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項30】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項31】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項32】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項33】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項34】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。

(2)

【請求項1】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項2】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項3】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項4】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項5】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項6】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項7】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項8】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項9】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項10】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項11】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項12】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項13】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項14】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項15】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項16】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項17】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項18】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項19】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項20】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項21】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項22】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項23】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項24】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項25】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項26】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項27】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項28】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項29】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項30】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項31】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項32】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項33】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。
【請求項34】 脱分化処理して得た未熟胚を形成させる、種子繁殖体の形質転換方法。

彼とする請求項1乃至29のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項31】 単子葉植物がイネ科植物であることを特徴とする請求項1乃至30のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項32】 単イネ科植物がイネまたはトウモロコシであることを特徴とする請求項1乃至31のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項33】 単イネ科植物がイネであることを特徴とする請求項1乃至32のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項34】 単イネ科植物がトウモロコシであることを特徴とする請求項1乃至33のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【発明の詳細な説明】
技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

背景技術
単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法 (PEG法)、パーティキュラリゼーション法その他が知られている。

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し形質転換を図る方法である。この方法で導入された遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている (Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6:1072-1074; Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276; Rhodes C.A. et al., 1988; Science 240:204-207)。

しかしながら、この方法は、1) プロトプラストからの単子葉植物の再生が確立されている植物種にのみ適用可能である。2) プロトプラストから細胞再生までには数か月を要するので、形質転換を得るのに時間がかかる。3) 培養期間が長期化するので、それに伴う培養費の増大が高くなり、正常な形質転換体を得る頻度が低くなる、という問題点を有する。

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激が原因で変化した点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはるかに低いと考えられる。この方法で形質転換体を得る頻度はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様の問題点を持つ (Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840; Datta S.K. et al., 1990; Biotech. 8:736-740)。

また最近、強い培養処理をしたトウモロコシ未熟胚およびイネ胚に電気刺激によって遺伝子を導入する方法が報告された (D' Haluin K. et al., 1992; Plant Cell 4:1495-1505)。導入された遺伝子の存在は再分化植物体においても確認されている。しかし、またこの方法で

の形質転換の成功例は一般のみである。

パーティキュラリゼーション法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速度で細胞あるいは組織に撃ち込むことによる形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行なうことができ、特にプロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効であるといえる。

今までにトウモロコシではタイプIIカルス (Armstrong C.L. and Green C.E., 1985; Planta 164:207-214) の材料にパーティキュラリゼーション法により形質転換を行ない、そこから正常な緑性を有する形質転換体を得た報告がいくつかある (Gordon-Kamm W.J. et al., 1990; Plant Cell 2:603-618; Fromm M.E. et al., 1990; Biotech. 8:833-839; Walters D.A. et al., 1992; Plant Mol. Biol. 18:189-200; Vain P. et al., 1993; Plant Cell Rep. 12:84-88)。

しかし、これらの報告のほとんどは、培養容易性の品種を材料として使用しており、また、あらゆる品種に適用できる技術には至っていない。

Vasiliらはパーティキュラリゼーション法によるコムギのエンバロ遺伝子 (Thompson C.J. et al., 1987; EMBO J. 6:3219-3223) とQDS遺伝子を導入し、バスター抵抗性のカルスおよび再生植物体を得た。これらのカルスおよび再生植物体における、導入遺伝子の産物である酵素の活性を確認し、またbar遺伝子が存在することをサザン分析で確認した (Vasili V. et al., 1992; Biotech. 10:667-674)。

いちはパーティキュラリゼーション法によってイネの未熟胚およびエンバロ遺伝子とカルスにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を導入し、ハイグロマイシンまたはピラフロキシド抵抗性再生植物体を得た。この植物体でのハイグロマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認した (Christou P. et al., 1991; Biotech. 9:957-962)。

Kozzielらはパーティキュラリゼーション法によってトウモロコシ未熟胚にbar遺伝子とR因子を導入し、ホスフィンノシン抵抗性植物体を得た。この植物体はホスフィンノシン抵抗性で、サザン分析により導入遺伝子の存在が確認された (Kozziel M.G. et al., 1993; Biotech. 11:194-200)。

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養 (Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139; Led

oux L. et al., 1974; Nature 249:17-21)。2) 花粉管への処理 (Luo and Wu, 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-173) リポソーム法 (Caboche M., 1990; Physiol. Plant. 79:173-176; Gad A.E. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36) があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言えない。

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉植物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないといわれている (De Cleene M., 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスバラガス (Bryce B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5345-5349)、そしてヤム (Dioscorea bulbifera) (Schaffner et al., 1987; Nature 327:529-532) で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科植物にはこの方法が適用できないといわれている (Potrykus I., 1990; Biotechnology 8:535-543)。

GrimsleyらはアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシトリックウイルス (Maize streak virus) のDNAを導入したものをトウモロコシ胚芽に接種したところ、トウモロコシトリックウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシトリックウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の問題点をアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入することであることを示すものと解釈している (Grimsley et al., 1987; Nature 325:177-179)。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても増殖する可能性があるため、この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種したときが最も高く (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのvir遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., 1989; Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

Coulthらはトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後、カナマイシン抵抗性遺伝子とQDS遺伝子を持った強固なアグロバクテリウムGV株を接種し、処理後の生長点をカナマイシンで選別したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子が導入した遺伝子を持つことを確認するためにサザン分析を行ったところ、一部の種子で導入遺伝子が確認された (Coulth J. et al., 1991; Plant Cell 3:425-434)。このことはアグロバクテリウム処理された生長点からカナマイシン選別にあり得た植物体には形質転換細胞と非形質転換細胞が混在していることを示す (キメラ現象)。

Mooneyらは、アグロバクテリウムを用いた小麦の胚に

カナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みる。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが確認されたが、このカルスから植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の増殖が認められた (Mooney P.A. et al., 1991; Plant Cell 1:219-228)。

Rahnerらはイネの胚に傷をつけた後、強固なアグロバクテリウムGV株 (pTi0804) をイネの8品目に接種したところ、日本晴、緑肥5号の2品種で胚の組織の増殖がみられた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とQDS遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖がみられた。この抵抗性カルスではQDS遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネの細胞に導入されたと解釈している (Rahner et al., 1990; Biotech. 8:33-38)。

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、何れも再現性に問題があるほか、導入した遺伝子の増殖について不満足で、説得できる結果が示されていない (Potrykus I., 1990; Biotech. 8:535-543)。

Chenらは2,4-D共存下で2日間培養したイネ未熟胚に付着した、ジャガイモ腫瘍培養細胞を含む培地でopt II遺伝子とQDS遺伝子を持ったアグロバクテリウムを接種した。処理した未熟胚をGV株接種地上で培養したところ誘導されたカルスから再分化植物体を得られた。再分化植物体およびその後代の植物体でのQDS遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、再分化世代、後代いずれの植物体でも導入遺伝子の存在が認められたことを報告している (Qian W.T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22:491-506)。この結果は、アグロバクテリウムによるイネの形質転換を支持するものであるが、形質転換率は1.0%と非常に低く、供試した未熟胚数500に対し、正常な生長を示した再生植物体は1個体は過ぎなかった。イネの未熟胚を接種するには多大な労力を要するため、このように低い形質転換効率では実用的なレベルにあるとは言い難い。

発明の要旨

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法およびパーティキュラリゼーション法である。エレクトロポレーション法の場合、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期を要し、多大な労力がかかり、また長期の培養により高頻度で変異体が出現するという危険性がある。また、この

方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。細胞をプロトプラストにしない程度の酵素処理をした未熟胚に電気刺激により高圧子導入を行なう方法 (D. Hattin et al., 1992) も報告されているが、まだ成功例は一例のみであり、今のところ一般的な手法とは言い難い。

そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、ダイブIIカクシあるいは未熟胚を用いたパーティクルガン法が試みられている。パーティクルガンを用いた場合、形質転換体を得る可能性は高いが、パーティクルガンという特別な装置が必要であり、この装置なしには形質転換は不可能である。また微細な金属微粒子の噴射による、葉緑体に対する低効率性も考えられる。またトウモロコシに対しては、生息点組織にアグロバクテリウムを感染させることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし生息点を感染する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。また本発明者らがこの手法によってトウモロコシ形質転換体の作出を試みたが、形質転換体は得られなかった (後述)。

従って、本発明の目的は従来の方法と比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対しては、も一般的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提案することである。

本発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉植物の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の脱分化処理に用いない未熟胚をアグロバクテリウム属細菌を用いて果實的に高い効率で形質転換ができること、そしてこの方法には再現性があり、これによれば上記目的を達成することができるとを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚の胚盤を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提案する。

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物の目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない脱分化処理していない未熟胚に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発明の方法では材料調製が容易な未熟胚を用いるので、生息点を用いる従来の技術に比べて供試材料を容易に得ることができ、また、形質転換は未熟胚の胚盤になされる

ため、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、トウモロコシや一部のイネ品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK32の構造方法を示す図である。

図2は、図1と同様にpRSB1の構造とプラスミドpSBL11の構造方法を示す図である。

本発明を実施するための最良の形態
本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。もともと、イネ、トウモロコシ、オオムギ及びコムギ等を包摂するイネ科植物が好ましく、とりわけトウモロコシが好ましい。

本発明において、未熟胚とは受粉後の発芽過程にある未熟種子の胚を言う。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ (熟期) は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよく、もともと、受粉後2日以後のものの方が好ましい。また、後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインプレッド、インプレッド間のFL、インプレッドと自然受粉品種間のFL、市販品種の未熟胚であることが好ましい。

また、本発明において、脱分化処理とは、植物組織の分化した細胞を脱分化培地において培養し、無秩序に増殖するカルス等の未分化状態の細胞塊を得るための処理である。

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、Tiプラスミド又はpTiプラスミドを持つ、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くはA. tumefaciens (Ti) 属細菌由来のTiプラスミドのヴィルレンス領域 (vir) 領域) 由来のDNA領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入されるか、またはこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組織等によりTiプラスミド中にin vivoで挿入されるものである。また、小腸らは、A. tumefaciens A281という強病原性の、形質転換効率が高くて高い株 (Hood E. E. et al., 1984; Hootch, 2:702-709, Hood E. E. et al., 1986; J. Bacteriol. 168:1283-1290, Komari, T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166:88-94, Jin, S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169:4417-4425, Komari, T., 1989; Plant Science 60:223-229, ATCC3734

9) に含まれるTiプラスミドpTiTos542のヴィルレンス領域 (vir) 領域) 由来のDNA領域を含むベクター (本明細書において、このベクターをスーパーバイナリーベクターと呼ぶことがある) を用いて、図1の例 (特開4-22357号) 同様、本発明では、このようなスーパーバイナリーベクターを好ましく用いることができる。

このようにスーパーバイナリーベクターの例としてpTOK162 (特開4-22257号) を挙げることができる。なお、その構造を図1に示す。このプラスミドは、大腸菌およびA. tumefaciens 中で増殖可能であるpTOK154と呼ばれるプラスミド (Ti) プラスミドから誘導された公知のpCA472プラスミドとpTOK101と呼ばれる公知の広宿主増殖プラスミドから後述の方法により構築された、Ti領域を含むプラスミド) にpTiTos542のヴィルレンス領域由来の脱分化領域に置換されたpTOK154を組み込み、KpnI断片 (virB, virC, virD, virE, virF, virG, virH, virI, virJ, virK, virL, virM, virN, virO, virP, virQ, virR, virS, virT, virU, virV, virW, virX, virY, virZ, virAA, virAB, virAC, virAD, virAE, virAF, virAG, virAH, virAI, virAJ, virAK, virAL, virAM, virAN, virAO, virAP, virAQ, virAR, virAS, virAT, virAU, virAV, virAW, virAX, virAY, virAZ, virBA, virBB, virBC, virBD, virBE, virBF, virBG, virBH, virBI, virBJ, virBK, virBL, virBM, virBN, virBO, virBP, virBQ, virBR, virBS, virBT, virBU, virBV, virBW, virBX, virBY, virBZ, virCA, virCB, virCC, virCD, virCE, virCF, virCG, virCH, virCI, virCJ, virCK, virCL, virCM, virCN, virCO, virCP, virCQ, virCR, virCS, virCT, virCU, virCV, virCW, virCX, virCY, virCZ, virDA, virDB, virDC, virDD, virDE, virDF, virDG, virDH, virDI, virDJ, virDK, virDL, virDM, virDN, virDO, virDP, virDQ, virDR, virDS, virDT, virDU, virDV, virDW, virDX, virDY, virDZ, virEA, virEB, virEC, virED, virEE, virEF, virEG, virEH, virEI, virEJ, virEK, virEL, virEM, virEN, virEO, virEP, virEQ, virER, virES, virET, virEU, virEV, virEW, virEX, virEY, virEZ, virFA, virFB, virFC, virFD, virFE, virFF, virFG, virFH, virFI, virFJ, virFK, virFL, virFM, virFN, virFO, virFP, virFQ, virFR, virFS, virFT, virFU, virFV, virFW, virFX, virFY, virFZ, virGA, virGB, virGC, virGD, virGE, virGF, virGG, virGH, virGI, virGJ, virGK, virGL, virGM, virGN, virGO, virGP, virGQ, virGR, virGS, virGT, virGU, virGV, virGW, virGX, virGY, virGZ, virHA, virHB, virHC, virHD, virHE, virHF, virHG, virHH, virHI, virHJ, virHK, virHL, virHM, virHN, virHO, virHP, virHQ, virHR, virHS, virHT, virHU, virHV, virHW, virHX, virHY, virHZ, virIA, virIB, virIC, virID, virIE, virIF, virIG, virIH, virIJ, virIK, virIL, virIM, virIN, virIO, virIP, virIQ, virIR, virIS, virIT, virIU, virIV, virIW, virIX, virIY, virIZ, virJA, virJB, virJC, virJD, virJE, virJF, virJG, virJH, virJI, virJJ, virJK, virJL, virJM, virJN, virJO, virJP, virJQ, virJR, virJS, virJT, virJU, virJV, virJW, virJX, virJY, virJZ, virKA, virKB, virKC, virKD, virKE, virKF, virKG, virKH, virKI, virKJ, virKL, virKM, virKN, virKO, virKP, virKQ, virKR, virKS, virKT, virKU, virKV, virKW, virKX, virKY, virKZ, virLA, virLB, virLC, virLD, virLE, virLF, virLG, virLH, virLI, virLJ, virLK, virLL, virLM, virLN, virLO, virLP, virLQ, virLR, virLS, virLT, virLU, virLV, virLW, virLX, virLY, virLZ, virMA, virMB, virMC, virMD, virME, virMF, virMG, virMH, virMI, virMJ, virMK, virML, virMN, virMO, virMP, virMQ, virMR, virMS, virMT, virMU, virMV, virMW, virMX, virMY, virMZ, virNA, virNB, virNC, virND, virNE, virNF, virNG, virNH, virNI, virNJ, virNK, virNL, virNM, virNO, virNP, virNQ, virNR, virNS, virNT, virNU, virNV, virNW, virNX, virNY, virNZ, virOA, virOB, virOC, virOD, virOE, virOF, virOG, virOH, virOI, virOJ, virOK, virOL, virOM, virON, virOP, virOQ, virOR, virOS, virOT, virOU, virOV, virOW, virOX, virOY, virOZ, virPA, virPB, virPC, virPD, virPE, virPF, virPG, virPH, virPI, virPJ, virPK, virPL, virPM, virPN, virPO, virPP, virPQ, virPR, virPS, virPT, virPU, virPV, virPW, virPX, virPY, virPZ, virQA, virQB, virQC, virQD, virQE, virQF, virQG, virQH, virQI, virQJ, virQK, virQL, virQM, virQN, virQO, virQP, virQQ, virQR, virQS, virQT, virQU, virQV, virQW, virQX, virQY, virQZ, virRA, virRB, virRC, virRD, virRE, virRF, virRG, virRH, virRI, virRJ, virRK, virRL, virRM, virRN, virRO, virRP, virRQ, virRR, virRS, virRT, virRU, virRV, virRW, virRX, virRY, virRZ, virSA, virSB, virSC, virSD, virSE, virSF, virSG, virSH, virSI, virSJ, virSK, virSL, virSM, virSN, virSO, virSP, virSQ, virSR, virSS, virST, virSU, virSV, virSW, virSX, virSY, virSZ, virTA, virTB, virTC, virTD, virTE, virTF, virTG, virTH, virTI, virTJ, virTK, virTL, virTM, virTN, virTO, virTP, virTQ, virTR, virTS, virTT, virTU, virTV, virTW, virTX, virTY, virTZ, virUA, virUB, virUC, virUD, virUE, virUF, virUG, virUH, virUI, virUJ, virUK, virUL, virUM, virUN, virUO, virUP, virUQ, virUR, virUS, virUT, virUU, virUV, virUW, virUX, virUY, virUZ, virVA, virVB, virVC, virVD, virVE, virVF, virVG, virVH, virVI, virVJ, virVK, virVL, virVM, virVN, virVO, virVP, virVQ, virVR, virVS, virVT, virVU, virVV, virVW, virVX, virVY, virVZ, virWA, virWB, virWC, virWD, virWE, virWF, virWG, virWH, virWI, virWJ, virWK, virWL, virWM, virWN, virWO, virWP, virWQ, virWR, virWS, virWT, virWU, virWV, virWW, virWX, virWY, virWZ, virXA, virXB, virXC, virXD, virXE, virXF, virXG, virXH, virXI, virXJ, virXK, virXL, virXM, virXN, virXO, virXP, virXQ, virXR, virXS, virXT, virXU, virXV, virXW, virXX, virXY, virXZ, virYA, virYB, virYC, virYD, virYE, virYF, virYG, virYH, virYI, virYJ, virYK, virYL, virYM, virYN, virYO, virYP, virYQ, virYR, virYS, virYT, virYU, virYV, virYW, virYX, virYY, virYZ, virZA, virZB, virZC, virZD, virZE, virZF, virZG, virZH, virZI, virZJ, virZK, virZL, virZM, virZN, virZO, virZP, virZQ, virZR, virZS, virZT, virZU, virZV, virZW, virZX, virZY, virZZ, virAA, virAB, virAC, virAD, virAE, virAF, virAG, virAH, virAI, virAJ, virAK, virAL, virAM, virAN, virAO, virAP, virAQ, virAR, virAS, virAT, virAU, virAV, virAW, virAX, virAY, virAZ, virBA, virBB, virBC, virBD, virBE, virBF, virBG, virBH, virBI, virBJ, virBK, virBL, virBM, virBN, virBO, virBP, virBQ, virBR, virBS, virBT, virBU, virBV, virBW, virBX, virBY, virBZ, virCA, virCB, virCC, virCD, virCE, virCF, virCG, virCH, virCI, virCJ, virCK, virCL, virCM, virCN, virCO, virCP, virCQ, virCR, virCS, virCT, virCU, virCV, virCW, virCX, virCY, virCZ, virDA, virDB, virDC, virDD, virDE, virDF, virDG, virDH, virDI, virDJ, virDK, virDL, virDM, virDN, virDO, virDP, virDQ, virDR, virDS, virDT, virDU, virDV, virDW, virDX, virDY, virDZ, virEA, virEB, virEC, virED, virEE, virEF, virEG, virEH, virEI, virEJ, virEK, virEL, virEM, virEN, virEO, virEP, virEQ, virER, virES, virET, virEU, virEV, virEW, virEX, virEY, virEZ, virFA, virFB, virFC, virFD, virFE, virFF, virFG, virFH, virFI, virFJ, virFK, virFL, virFM, virFN, virFO, virFP, virFQ, virFR, virFS, virFT, virFU, virFV, virFW, virFX, virFY, virFZ, virGA, virGB, virGC, virGD, virGE, virGF, virGG, virGH, virGI, virGJ, virGK, virGL, virGM, virGN, virGO, virGP, virGQ, virGR, virGS, virGT, virGU, virGV, virGW, virGX, virGY, virGZ, virHA, virHB, virHC, virHD, virHE, virHF, virHG, virHH, virHI, virHJ, virHK, virHL, virHM, virHN, virHO, virHP, virHQ, virHR, virHS, virHT, virHU, virHV, virHW, virHX, virHY, virHZ, virIA, virIB, virIC, virID, virIE, virIF, virIG, virIH, virIJ, virIK, virIL, virIM, virIN, virIO, virIP, virIQ, virIR, virIS, virIT, virIU, virIV, virIW, virIX, virIY, virIZ, virJA, virJB, virJC, virJD, virJE, virJF, virJG, virJH, virJI, virJJ, virJK, virJL, virJM, virJN, virJO, virJP, virJQ, virJR, virJS, virJT, virJU, virJV, virJW, virJX, virJY, virJZ, virKA, virKB, virKC, virKD, virKE, virKF, virKG, virKH, virKI, virKJ, virKL, virKM, virKN, virKO, virKP, virKQ, virKR, virKS, virKT, virKU, virKV, virKW, virKX, virKY, virKZ, virLA, virLB, virLC, virLD, virLE, virLF, virLG, virLH, virLI, virLJ, virLK, virLM, virLN, virLO, virLP, virLQ, virLR, virLS, virLT, virLU, virLV, virLW, virLX, virLY, virLZ, virMA, virMB, virMC, virMD, virME, virMF, virMG, virMH, virMI, virMJ, virMK, virML, virMN, virMO, virMP, virMQ, virMR, virMS, virMT, virMU, virMV, virMW, virMX, virMY, virMZ, virNA, virNB, virNC, virND, virNE, virNF, virNG, virNH, virNI, virNJ, virNK, virNL, virNM, virNO, virNP, virNQ, virNR, virNS, virNT, virNU, virNV, virNW, virNX, virNY, virNZ, virOA, virOB, virOC, virOD, virOE, virOF, virOG, virOH, virOI, virOJ, virOK, virOL, virOM, virON, virOP, virOQ, virOR, virOS, virOT, virOU, virOV, virOW, virOX, virOY, virOZ, virPA, virPB, virPC, virPD, virPE, virPF, virPG, virPH, virPI, virPJ, virPK, virPL, virPM, virPN, virPO, virPP, virPQ, virPR, virPS, virPT, virPU, virPV, virPW, virPX, virPY, virPZ, virQA, virQB, virQC, virQD, virQE, virQF, virQG, virQH, virQI, virQJ, virQK, virQL, virQM, virQN, virQO, virQP, virQQ, virQR, virQS, virQT, virQU, virQV, virQW, virQX, virQY, virQZ, virRA, virRB, virRC, virRD, virRE, virRF, virRG, virRH, virRI, virRJ, virRK, virRL, virRM, virRN, virRO, virRP, virRQ, virRR, virRS, virRT, virRU, virRV, virRW, virRX, virRY, virRZ, virSA, virSB, virSC, virSD, virSE, virSF, virSG, virSH, virSI, virSJ, virSK, virSL, virSM, virSN, virSO, virSP, virSQ, virSR, virSS, virST, virSU, virSV, virSW, virSX, virSY, virSZ, virTA, virTB, virTC, virTD, virTE, virTF, virTG, virTH, virTI, virTJ, virTK, virTL, virTM, virTN, virTO, virTP, virTQ, virTR, virTS, virTT, virTU, virTV, virTW, virTX, virTY, virTZ, virUA, virUB, virUC, virUD, virUE, virUF, virUG, virUH, virUI, virUJ, virUK, virUL, virUM, virUN, virUO, virUP, virUQ, virUR, virUS, virUT, virUU, virUV, virUW, virUX, virUY, virUZ, virVA, virVB, virVC, virVD, virVE, virVF, virVG, virVH, virVI, virVJ, virVK, virVL, virVM, virVN, virVO, virVP, virVQ, virVR, virVS, virVT, virVU, virVW, virVX, virVY, virVZ, virWA, virWB, virWC, virWD, virWE, virWF, virWG, virWH, virWI, virWJ, virWK, virWL, virWM, virWN, virWO, virWP, virWQ, virWR, virWS, virWT, virWU, virWV, virWW, virWX, virWY, virWZ, virXA, virXB, virXC, virXD, virXE, virXF, virXG, virXH, virXI, virXJ, virXK, virXL, virXM, virXN, virXO, virXP, virXQ, virXR, virXS, virXT, virXU, virXV, virXW, virXX, virXY, virXZ, virYA, virYB, virYC, virYD, virYE, virYF, virYG, virYH, virYI, virYJ, virYK, virYL, virYM, virYN, virYO, virYP, virYQ, virYR, virYS, virYT, virYU, virYV, virYW, virYX, virYZ, virZA, virZB, virZC, virZD, virZE, virZF, virZG, virZH, virZI, virZJ, virZK, virZL, virZM, virZN, virZO, virZP, virZQ, virZR, virZS, virZT, virZU, virZV, virZW, virZX, virZY, virZZ, virAA, virAB, virAC, virAD, virAE, virAF, virAG, virAH, virAI, virAJ, virAK, virAL, virAM, virAN, virAO, virAP, virAQ, virAR, virAS, virAT, virAU, virAV, virAW, virAX, virAY, virAZ, virBA, virBB, virBC, virBD, virBE, virBF, virBG, virBH, virBI, virBJ, virBK, virBL, virBM, virBN, virBO, virBP, virBQ, virBR, virBS, virBT, virBU, virBV, virBW, virBX, virBY, virBZ, virCA, virCB, virCC, virCD, virCE, virCF, virCG, virCH, virCI, virCJ, virCK, virCL, virCM, virCN, virCO, virCP, virCQ, virCR, virCS, virCT, virCU, virCV, virCW, virCX, virCY, virCZ, virDA, virDB, virDC, virDD, virDE, virDF, virDG, virDH, virDI, virDJ, virDK, virDL, virDM, virDN, virDO, virDP, virDQ, virDR, virDS, virDT, virDU, virDV, virDW, virDX, virDY, virDZ, virEA, virEB, virEC, virED, virEE, virEF, virEG, virEH, virEI, virEJ, virEK, virEL, virEM, virEN, virEO, virEP, virEQ, virER, virES, virET, virEU, virEV, virEW, virEX, virEY, virEZ, virFA, virFB, virFC, virFD, virFE, virFF, virFG, virFH, virFI, virFJ, virFK, virFL, virFM, virFN, virFO, virFP, virFQ, virFR, virFS, virFT, virFU, virFV, virFW, virFX, virFY, virFZ, virGA, virGB, virGC, virGD, virGE, virGF, virGG, virGH, virGI, virGJ, virGK, virGL, virGM, virGN, virGO, virGP, virGQ, virGR, virGS, virGT, virGU, virGV, virGW, virGX, virGY, virGZ, virHA, virHB, virHC, virHD, virHE, virHF, virHG, virHH, virHI, virHJ, virHK, virHL, virHM, virHN, virHO, virHP, virHQ, virHR, virHS, virHT, virHU, virHV, virHW, virHX, virHY, virHZ, virIA, virIB, virIC, virID, virIE, virIF, virIG, virIH, virIJ, virIK, virIL, virIM, virIN, virIO, virIP, virIQ, virIR, virIS, virIT, virIU, virIV, virIW, virIX, virIY, virIZ, virJA, virJB, virJC, virJD, virJE, virJF, virJG, virJH, virJI, virJJ, virJK, virJL, virJM, virJN, virJO, virJP, virJQ, virJR, virJS, virJT, virJU, virJV, virJW, virJX, virJY, virJZ, virKA, virKB, virKC, virKD, virKE, virKF, virKG, virKH, virKI, virKJ, virKL, virKM, virKN, virKO, virKP, virKQ, virKR, virKS, virKT, virKU, virKV, virKW, virKX, virKY, virKZ, virLA, virLB, virLC, virLD, virLE, virLF, virLG, virLH, virLI, virLJ, virLK, virLM, virLN, virLO, virLP, virLQ, virLR, virLS, virLT, virLU, virLV, virLW, virLX, virLY, virLZ, virMA, virMB, virMC, virMD, virME, virMF, virMG, virMH, virMI, virMJ, virMK, virML, virMN, virMO, virMP, virMQ, virMR, virMS, virMT, virMU, virMV, virMW, virMX, virMY, virMZ, virNA, virNB, virNC, virND, virNE, virNF, virNG, virNH, virNI, virNJ, virNK, virNL, virNM, virNO, virNP, virNQ, virNR, virNS, virNT, virNU, virNV, virNW, virNX, virNY, virNZ, virOA, virOB, virOC, virOD, virOE, virOF, virOG, virOH, virOI, virOJ, virOK, virOL, virOM, virON, virOP, virOQ, virOR, virOS, virOT, virOU, virOV, virOW, virOX, virOY, virOZ, virPA, virPB, virPC, virPD, virPE, virPF, virPG, virPH, virPI, virPJ, virPK, virPL, virPM, virPN, virPO, virPP, virPQ, virPR, virPS, virPT, virPU, virPV, virPW, virPX, virPY, virPZ, virQA, virQB, virQC, virQD, virQE, virQF, virQG, virQH, virQI, virQJ, virQK, virQL, virQM, virQN, virQO, virQP, virQQ, virQR, virQS, virQT, virQU, virQV, virQW, virQX, virQY, virQZ, virRA, virRB, virRC, virRD, virRE, virRF, virRG, virRH, virRI, virRJ, virRK, virRL, virRM, virRN, virRO, virRP, virRQ, virRR, virRS, virRT, virRU, virRV, virRW, virRX, virRY, virRZ, virSA, virSB, virSC, virSD, virSE, virSF, virSG, virSH, virSI, virSJ, virSK, virSL, virSM, virSN, virSO, virSP, virSQ, virSR, virSS, virST, virSU, virSV, virSW, virSX, virSY, virSZ, virTA, virTB, virTC, virTD, virTE, virTF, virTG, virTH, virTI, virTJ, virTK, virTL, virTM, virTN, virTO, virTP, virTQ, virTR, virTS, virTT, virTU, virTV, virTW, virTX, virTY, virTZ, virUA, virUB, virUC, virUD, virUE, virUF, virUG, virUH, virUI, virUJ, virUK, virUL, virUM, virUN, virUO, virUP, virUQ, virUR, virUS, virUT, virUU, virUV, virUW, virUX, virUY, virUZ, virVA, virVB, virVC, virVD, virVE, virVF, virVG, virVH, virVI, virVJ, virVK, virVL, virVM, virVN, virVO, virVP, virVQ, virVR, virVS, virVT, virVU, virVW, virVX, virVY, virVZ, virWA, virWB, virWC, virWD, virWE, virWF, virWG, virWH, virWI, virWJ, virWK, virWL, virWM, virWN, virWO, virWP, virWQ, virWR, virWS, virWT, virWU, virWV, virWW, virWX, virWY, virWZ, virXA, virXB, virXC, virXD, virXE, virXF, virXG, virXH, virXI, virXJ, virXK, virXL, virXM, virXN, virXO, virXP, virXQ, virXR, virXS, virXT, virXU, virXV, virXW, virXX, virXY, virXZ, virYA, virYB, virYC, virYD, virYE, virYF, virYG, virYH, virYI, virYJ, virYK, virYL, virYM, virYN, virYO, virYP, virYQ, virYR, virYS, virYT, virYU, virYV, virYW, virYX, virYZ, virZA, virZB, virZC, virZD, virZE, virZF, virZG, virZH, virZI, virZJ, virZK, virZL, virZM, virZN, virZO, virZP, virZQ, virZR, virZS, virZT, virZU, virZV, virZW, virZX, virZY, virZZ, virAA, virAB, virAC, virAD, virAE, virAF, virAG, virAH, virAI, virAJ, virAK, virAL, virAM, virAN, virAO, virAP, virAQ, virAR, virAS, virAT, virAU, virAV, virAW, virAX, virAY, virAZ, virBA, virBB, virBC, virBD, virBE, virBF, virBG, virBH, virBI, virBJ, virBK, virBL, virBM, virBN, virBO, virBP, virBQ, virBR, virBS, virBT, virBU, virBV, virBW, virBX, virBY, virBZ, virCA, virCB, virCC, virCD, virCE, virCF, virCG, virCH, virCI, virCJ, virCK, virCL, virCM, virCN, virCO, virCP, virCQ, virCR, virCS, virCT, virCU, virCV, virCW, virCX, virCY, virCZ, virDA, virDB, virDC, virDD, virDE, virDF, virDG, virDH, virDI, virDJ, virDK, virDL, virDM, virDN, virDO, virDP, virDQ, virDR, virDS, virDT, virDU, virDV, virDW, virDX, virDY, virDZ, virEA, virEB, virEC, virED, virEE, virEF, virEG, virEH, virEI, virEJ, virEK, virEL, virEM, virEN, virEO, virEP, virEQ, virER, virES, virET, virEU, virEV, virEW, virEX, virEY, virEZ, virFA, virFB, virFC, virFD, virFE, virFF, virFG, virFH, virFI, virFJ, virFK, virFL, virFM, virFN, virFO, virFP, virFQ, virFR, virFS, virFT, virFU, virFV, virFW, virFX, virFY, virFZ, virGA, virGB, virGC, virGD, virGE, virGF, virGG, virGH, virGI, virGJ, virGK, virGL, virGM, virGN, virGO, virGP, virGQ, virGR, virGS, virGT, virGU, virGV, virGW, virGX, virGY, virGZ, virHA, virHB, virHC, virHD, virHE, virHF, virHG, virHH, virHI, virHJ, virHK, virHL, virHM, virHN, virHO, virHP, virHQ, virHR, virHS, virHT, virHU, virHV, virHW, virHX, virHY, virHZ, virIA, virIB, virIC, virID, virIE, virIF, virIG, virIH, virIJ, virIK, virIL, virIM, virIN, virIO, virIP, virIQ, virIR, virIS, virIT, virIU, virIV, virIW, virIX, virIY, virIZ, virJA, virJB, virJC, virJD, virJE, virJF, virJG, virJH, virJI, virJJ, virJK, virJL, virJM, virJN, virJO, virJP, virJQ, virJR, virJS, virJT, virJU, virJV, virJW, virJX, virJY, virJZ, virKA, virKB, virKC, virKD, virKE, virKF, virKG, virKH, virKI, virKJ, virKL, virKM, virKN, virKO, virKP, virKQ, virKR, virKS, virKT, virKU, virKV, virKW, virKX, virKY, virKZ, virLA, virLB, virLC, virLD, virLE, virLF, virLG, virLH, virLI, virLJ, virLK, virLM, virLN, virLO, virLP, virLQ, virLR, virLS, virLT, virLU, virLV, virLW, virLX, virLY, virLZ, virMA, virMB, virMC, virMD, virME, virMF, virMG, virMH, virMI, virMJ, virMK, virML, virMN, virMO, virMP, virMQ, virMR, virMS, virMT, virMU, virMV, virMW, virMX, virMY, virMZ, virNA, virNB, virNC, virND, virNE, virNF, virNG, virNH, virNI, virNJ, virNK, virNL, virNM, virNO, virNP, virNQ, virNR, virNS, virNT, virNU, virNV, virNW, virNX, virNY, virNZ, virOA, virOB, virOC, virOD, virOE, virOF, virOG, virOH, virOI, virOJ, virOK, virOL, virOM, virON, virOP, virOQ, virOR, virOS, virOT, virOU, virOV, virOW, virOX, virOY, virOZ, virPA, virPB, virPC, virPD, virPE, virPF, virPG, virPH, virPI, virPJ, virPK, virPL, virPM, virPN, virPO, virPP, virPQ, virPR, virPS, virPT, virPU, virPV, virPW, virPX, virPY, virPZ, virQA, virQB, virQC, virQD, virQE, virQF, virQG, virQH, virQI, virQJ, virQK, virQL, virQM, virQN, virQO, virQP, virQQ, virQR, virQS, virQT, virQU, virQV, virQW, virQX, virQY, virQZ, virRA, virRB, virRC, virRD, virRE, virRF, virRG, virRH, virRI, virRJ, virRK, virRL, virRM, virRN, virRO, virRP, virRQ, virRR, virRS, virRT, virRU, virRV, virRW, virRX, virRY, virRZ, virSA, virSB, virSC, virSD, virSE, virSF, virSG, virSH, virSI, virSJ, virSK, virSL, virSM, virSN, virSO, virSP, virSQ, virSR, virSS, virST, virSU, virSV, virSW, virSX, virSY, virSZ, virTA, virTB, virTC, virTD, virTE, virTF, virTG, virTH, virTI, virTJ, virTK, virTL, virTM, virTN, virTO, virTP, virTQ, virTR, virTS, virTT, virTU, virTV, virTW, virTX, virTY, virTZ, virUA, virUB, virUC, virUD, virUE, virUF, virUG, virUH, virUI, virUJ, virUK, virUL, virUM, virUN, virUO, virUP, virUQ, virUR, virUS, virUT, virUU, virUV, virUW, virUX, virUY, virUZ, virVA, virVB, virVC, virVD, virVE, virVF, virVG, virVH, virVI, virVJ, virVK, virVL, virVM, virVN, virVO, virVP, virVQ, virVR, virVS, virVT, virVU, virVW, virVX, virVY, virVZ, virWA, virWB, virWC, virWD, virWE, virWF, virWG, virWH, virWI, virWJ, virWK, virWL, virWM, virWN, virWO, virWP, virWQ, virWR, virWS, virWT, virWU, virWV, virWW, virWX, virWY, virWZ, virXA, virXB, virXC, virXD, virXE, virXF, virXG, virXH, virXI, virXJ, virXK, virXL, virXM, virXN, virXO, virXP, virXQ, virXR, virXS, virXT, virXU, virXV, virXW, virXX, virXY, virXZ, virYA, virYB, virYC, virYD, virYE, virYF, virYG, virYH, virYI, virYJ, virYK, virYL, virYM, virYN, virYO, virYP, virYQ, virYR, virYS, virYT, virYU, virYV, virYW, virYX, virYZ, virZA, virZB, virZC, virZD, virZE, virZF, virZG, virZH, virZI, virZJ, virZK, virZL, virZM, virZN, virZO, virZP, virZQ, virZR, virZS, virZT, virZU, virZV, virZW, virZX, virZY, virZZ, virAA, virAB, virAC, virAD, virAE, virAF, virAG, virAH, virAI, virAJ, virAK, virAL, virAM, virAN, virAO, virAP, virAQ, virAR, virAS, virAT, virAU, virAV, virAW, virAX, virAY, virAZ, virBA, virBB, virBC, virBD, virBE, virBF, virBG, virBH, virBI, virBJ, virBK, virBL, virBM, virBN, virBO, virBP, virBQ, virBR, virBS, virBT, virBU, virBV, virBW, virBX, virBY, virBZ, virCA, virCB, virCC, virCD, virCE, virCF, virCG, virCH, virCI, virCJ, virCK, virCL, virCM, virCN, virCO, virCP, virCQ, virCR, virCS, virCT, virCU, virCV, virCW, virCX, virCY, virCZ, virDA, virDB, virDC, virDD, virDE, virDF, virDG, virDH, virDI, virDJ, virDK, virDL, virDM, virDN, virDO, virDP, virDQ, virDR, virDS, virDT, virDU, virDV, virDW, virDX, virDY, virDZ, virEA, virEB, virEC, virED, virEE, virEF, virEG, virEH, virEI, virEJ, virEK, virEL, virEM, virEN, virEO, virEP, virEQ, virER, virES, virET, virEU, virEV, virEW, virEX, virEY, virEZ, virFA, virFB, virFC, virFD, virFE, virFF, virFG, virFH, virFI, virFJ, virFK, virFL, virFM, virFN, virFO, virFP, virFQ, virFR, virFS, virFT, virFU, virFV, virFW, virFX, virFY, virFZ, virGA, virGB, virGC, virGD, virGE, virGF, virGG, virGH, virGI, virGJ, virGK, virGL, virGM, virGN, virGO, virGP, virGQ, virGR, virGS, virGT, virGU, virGV, virGW, virGX, virGY, virGZ, virHA, virHB, virHC, virHD, virHE, virHF, virHG, virHH, virHI, virHJ, virHK, virHL, virHM, virHN, virHO, virHP, virHQ, virHR, virHS, virHT, virHU, virHV, virHW, virHX, virHY, virHZ, virIA, virIB, virIC, virID, virIE, virIF, virIG, virIH, virIJ, virIK, virIL, virIM, virIN, virIO, virIP, virIQ, virIR, virIS, virIT, virIU, virIV, virIW, virIX, virIY, virIZ, virJA, virJB, virJC, virJD, virJE, virJF, virJG, virJH, virJI, virJJ, virJK, virJL, virJM, virJN, virJO, virJP, virJQ, virJR, virJS, virJT, virJU, virJV, virJW, virJX, virJY, virJZ, virKA, virKB, virKC, virKD, virKE, virKF, virKG, virKH, virKI, virKJ, virKL, virKM, virKN, virKO, virKP, virKQ, virKR, virKS, virKT, virKU, virKV, virKW, virKX, virKY, virKZ, virLA, virLB, virLC, virLD, virLE, virLF, virLG, virLH, virLI, virLJ, virLK, virLM, virLN, virLO, virLP, virLQ, virLR, virLS, virLT, virLU, virLV, virLW, virLX, virLY, virLZ, virMA, virMB, virMC, virMD, virME, virMF, virMG, virMH, virMI, virMJ, virMK, virML, virMN, virMO, virMP, virMQ, virMR, virMS, virMT, virMU, virMV, virMW, virMX, virMY, virMZ, virNA, virNB, virNC, virND, virNE, virNF, virNG, virNH, virNI, virNJ, virNK, virNL, virNM, virNO, virNP, virNQ, virNR, virNS, virNT, virNU, virNV, virNW, virNX, virNY, virNZ, virOA, virOB, virOC, virOD, virOE, virOF, virOG, virOH, virOI, virOJ, virOK, virOL, virOM, virON, virOP, virOQ, virOR, virOS, virOT, virOU, virOV, virOW, virOX, virOY, virOZ, virPA, virPB, virPC, virPD, virPE, virPF, virPG, virPH, virPI, virPJ, virPK, virPL, virPM, virPN, virPO, virPP,

特にトウモロコシでは、形質転換処理の前に脱分化処理を行うと、形質転換率が低下するので、このような植物では、前処理を行なう本発明の方法により形質転換効率を高めることができる。また、従来、アグロバクテリウム属菌で植物を形質転換する際に、感染効率が高くなるように、植物に傷をつけたり、酵素処理して細胞壁をある程度溶かしからアグロバクテリウム属菌を感染させていた。本発明の方法では、このような前処理を行ってもよいが、本発明者らは、このような前処理を行わなくても効率よく形質転換が行えることを見出した。特に、トウモロコシの場合には、付着することによる感染後脱カルスへ誘導する効率が低下するので、このような前処理を行わないことが好ましい。

形質転換した未熟胚は、その後、公知の方法 (Green, C.E. and Phillips, R.L., 1975; Crop Science 15:417-421; Duncan, D.R. et al., 1995; Planta 165:322-332) により脱分化され、脱分化状態で形質転換細胞の選別、増殖を行うことが好ましい。選別は、前記所望の遺伝子の発現に基づいて行うことができる。脱分化状態の細胞は、正常個体再生能力を有するカルスであることが好ましい。形質転換細胞からの植物体の再生は公知の方法 (Lu, protio, E. and Lussardi, H.C. 1988; Mydica XXXII:163-177) により行うことができる。これにより所望の形質を獲得した植物体、好ましくは、所望の形質を獲得し、正常遺伝性を有する形質転換植物体を再生することができ、なお、これらの具体的操作の一例が下記実施例に詳述されている。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

(1) 供試組織の調製

(i) トウモロコシの品種
トウモロコシ品種P3732, A188, H94, 837Hc, MoJ7Hc, W117Hc, Oh43, H99, W64A Hc rhm, Fl (A188 x B1ac k Mexican Sweet), F1 (A188 x B73Hc), F1 (B73Hc x A188), Fl (A188 x A188), Fl (MoJ7Hc x A188), F1 (C103 x A188) を材料として決定した。P3732は抽出路農協組合より入手。全てのインプレット及びB1ack Me xican Sweetのいずれの品種も農林水産省生物資源研究所から入手した。

(ii) イネの品種

日本品種、月の光を選定して供試した。

(iii) トウモロコシ胚組織の調製

垂直果樹ナトリウムに5分間浸漬後滅菌水で3回洗浄した。洗浄後と胚体抽出 (LS主要塩類、L緩衝塩類 (Lins mair E. and Skoog F. 1965; Physiol. Plant. 18:100-112) 7)、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg/lピリドキシン塩酸塩、1mg/lチアミン塩酸塩、100mg/lイオノシントール、

100mg/lカザリノ酸、700mg/lプロリン、20g/lショ糖、2.3g/lザラシト)に浸漬し25℃、照明下で培養した。約4日後、発芽した幼苗から頂端分生組織を含む約0.1x0.3mmの組織を切り出し材料とした。
(iv) トウモロコシ未熟胚の調製
花粉受精後約14日目に雌雄から長さ1~2mmの未熟胚を無菌的に単離した。
(v) イネ未熟胚の調製
開花後、7~12日目の未熟胚子を鞘を除去した後、70%エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。
(2) Tiプラスミド
ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (hpt)、ホスフィノスリン (pnt) 抵抗性遺伝子 (bar) およびQ5遺伝子をTiプラスミドのT-DNA領域に組み込んだ。以下のプラスミドを作成した。
(i) pIC21Hm:
ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを含むQ5遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991; 植物バイオテクノロジー-II (現代化学増刊, pp.123-132), 名古屋大学、中村氏より入手)。
(ii) pICQ32:
(a) イントロンQ5およびハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター-pICQ29への導入
Ti由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むC1a1断片 (2.3kb) をクレボー処理により末端を平滑化し、これをpICQ32のSma I部位に挿入し、アンピシリンおよびスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミドpICQ107 (5.2kb) を付した。pICQ107をEcoR I, Hind IIIで処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5kb断片をpCA482のEcoR I, Hind III断片 (2.7kb) と連結し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子とHind III, Hpa I部位を含むpICQ170 (5.2kb) を得た。
35Sプロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロンとQ5遺伝子を連結したベクター-pICQ21 (Ohia et al 1990, 名古屋大学中村氏より譲渡) をEcoR Iで切断後クレノー酵素により末端を平滑化しHind IIIリシンタープロモーターおよびイントロンQ5を含む断片をHind IIIにより切り出し、35Sプロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結したpQ2 (J. Paszkowski, Friedrich Miescher Instituteより入手) のHind III部位に挿入しpQ2-1G (7.6kb) を得た。なお、pQ2はpDR1 (Piet razak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14:1987-5888) にハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gratz L. and Davis J. 1983; Gene 25:179-188) を挿入したものであ

た。
(b) スーパーバイナリベクター-pTK162への導入
スーパーバイナリベクターに強顕性アグロバクテリウムA28由来のvtrb, vtrc, vtrd遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリベクター-pTK162への目的遺伝子 (ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンQ5遺伝子) の導入は相同組換えによって行なった。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドp8332に由来する部位を持つので、スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜された菌は両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることになる。スーパーバイナリベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンQ5遺伝子が組み込まれたプラスミドをpICQ32と呼ぶ (図1参照)。
なお、図1及び後述の図2において、「SP」はスペクチノマイシン抵抗性遺伝子、「hpt」はハイグロマイシン抵抗性遺伝子、「pnt」はカナマイシン抵抗性遺伝子、「TCI」はテトラサイクリン抵抗性遺伝子、「BAR」はホスフィノスリン抵抗性遺伝子、「IG」はイントロンQ5遺伝子、「ORI」はT-DNAの右ボウダー配列、「B」はT-DNAの左ボウダー配列、「vtrb, vtrc, vtrd」は強顕性アグロバクテリウムA28由来のvtr領域、「ORI」はCo IEの複製開始点、「CDS」はラムファージのQ5部位、「K」は制限酵素Kpn I部位、「H」は制限酵素Hin d III部位を示す。
(iii) pS81J1
(a) pS81J1の構築
pICQ170をBamH IおよびBgl IIで切断後選別し、pVS138とした。pVS138をEcoR IおよびAseIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後、Sal I リンカー (5'-GTCGAC C-3') を挿入し閉鎖しpVS151を作成した。pVS151をSal Iで切断し、この部位に、pCA643 (An et al., Plant Molecular Biology Manual A3:1-19, Kluwer Academic, Dordrecht, 1998) のT-DNAを含む4.7kbのSal I断片を導入しpICQ235を作成した。pICQ235をSac II部位で切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化後、Hind III リンカー (5'-GACCTTCG-3') を挿入し閉鎖し、得られたプラスミドをpICQ246と命名した。pICQ246をHind IIIおよびEcoR Iで切断し、T-DNA中の大部分のDNAを除去した後、35Sプロモーターにホスフィノスリンターセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (特許平1-503434) を複製した遺伝子 (bar) を付する。pVS151をSac IIで切断し、Hind III断片を挿入しpS81J1を得た。さらに、pS81J1をHind IIIで切断し、pICQ246と命名した。pICQ246をHind III断片を挿入しpS81J1を得た。すなわち、pS81J1は、T-DNA領域中に、植物中で発現するイントロンQ5遺伝子とホスフィノスリン耐性遺伝子 (bar) を含む中間ベクターである。

(b) pMB1の構築

pVCQ101 (Knäuf et al., Plasmid 8:45-54, 1982) をEcoR Iにより切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後閉鎖することによってEcoR I部位を創設した。さらに、Bgl IIで切断後閉鎖する操作を行ったところ、Bgl II部位が創設されたので、このプラスミドをpVCQ101と命名した。pVCQ101をHind IIIとXba Iで切断し、Hind III-Sal IをHind IIIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後EcoR Iで切断し、Hind III部位をEcoR Iで切断し、Xba I リンカー (5'-CCCAATTCCG-3') を挿入し閉鎖することにより、Hind III部位をEcoR I部位に変換し、pICQ239とした。pCA482をHpa Iで切断し、Xba I リンカー (5'-GTCGACG-3') を挿入し閉鎖してpICQ236を作成した。pICQ236をXba IおよびEcoR Iで切断し、64断片を単離した。pICQ239をEcoR IおよびXba Iで切断し、2.7kb断片を除去し、pICQ236の2.7kb Xba I-EcoR I断片を挿入し閉鎖してpMB1を作成した。pMB1は、アグロバクテリウムの1種であるが、T-DNAをグロウイルス領域由来のDNAなどは含まない。

(c) pS81J2の構築

pMB1をKpn Iで切断し、pT180542 (Amertican Type Culture Collection受託番号37349) のグロウイルス領域のvtrbおよびvtrc遺伝子を含む15.2kb Kpn I断片を挿入して閉鎖してpS81とした。pS81は、アグロバクテリウムの一種であり、これに、T-DNAを含む中間ベクターを組み込んだハイブリッドベクターを作成した。ヘルパープラスミドと組合わせることにより、スーパーバイナリベクターを構成することができる。

(d) pS81J3の構築

pICQ232の場合と同様に、pS81J1を相同組換えによってpS81J2に導入することによってpS81J2を作成した (図2参照)。

(3) 寄生アグロバクテリウム

T-DNA領域を創設した菌株、LB44404とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LB44404はヘルパープラスミド (vtr領域を完全な形で持つ) PAU4404を有する菌株であり、American Type Culture Collectionより入手可能である (ATCC 37349)。EHA101はヘルパープラスミドのvtr領域が顕性アグロバクテリウムA28由来であり、Hood E.E. et al. 1986 (上掲) から入手可能である。

(2) 項で述べた種々のバイナリベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の組成を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細胞の三葉液法 (Ohita et al., 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) によった。

LB44404 (pS81J2)

LB44404 (pS81J1)

EHA101 (pICQ21Hm)

17

- (4) アグロバクテリウム懸液の調整
AP培養地 (Difco K.A. and Kado C.T. 1974; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3677-3681) 上で3〜10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、トリモロコシへの接種には細胞懸濁液5μl培地 (LS主要塩類、LS微量塩類、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg 1ピリドキシン塩類、1mg 1チアミン塩類、100mg 13オインキントール、1.5mg 12,4-D、1g 1カザミン酸、100μM アセトシリンゴン、0.2Mβニグ、0.2Mグルコース) に、イネへの接種には修正AA培地 (AA主要無機塩類、AA7ミノ酸及びAA6ビタミン類 (Toriyama K. and Hinata K. 1958; Plant Sci. 41:179-183)、M6微量塩類 (Murashige, T. and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15:473-497)、1.0g 1カザミン酸、100μMアセトシリンゴン、0.2Mβニグ、0.2Mグルコース) に各々懸濁し、菌濃度を3〜5x10⁸細胞/mlに調整し用いた。

(5) 接種および培養条件

- 供試組織を滅菌水で洗浄後、茎頂組織はガラス針 (自家製) で穿刺後、未熟胚はそのままのアグロバクテリウム懸濁液に3〜20分間浸漬した。浸漬処理後、茎頂組織は100μMアセトシリンゴン、20g 12,4-D、10g 1グルコースを含む修正LS培地 (LS主要塩類、LS微量塩類、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg 1ピリドキシン塩類、1mg 1チアミン塩類、1mg 1チアミン塩類、100mg 13オインキントール、0.1mg 1カザミン酸、1.0mg 1カザミン酸、2.3g 1グルイト) に移植し、25℃、暗所で2〜3日間培養した。その後、250mg 1セフォキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォキシムを含むLS培地で培養を続け、浸漬処理後のトリモロコシ未熟胚は100μMアセトシリンゴン、20g 12,4-D、10g 1グルコースを含む修正LS主要塩類、LS微量塩類、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg 1ピリドキシン塩類、1mg 1チアミン塩類、100mg 13オインキントール、1.5mg 12,4-D、700mg 1プロリン、500mg 1MES、8g 1糖類) に移植し、25℃、暗所で1〜5日間培養した。その後、洗浄することなく (洗浄すると形質転換植物の再生効率が低下) 接種未熟胚を250mg 1セフォキシムを含む修正LS主要塩類、LS微量塩類、0.5mg/mlニコチン酸、0.5mg 1ピリドキシン塩類、1mg 1チアミン塩類、1mg 1チアミン塩類、100mg 13オインキントール、0.1mg 1カザミン酸、1.0mg 1カザミン酸、2.3g 1グルイト) で培養を続けた。また、浸漬処理後のイネ未熟胚はアセトシリンゴン、シロ、グルコースを同濃度で含む2Mβニグの無機塩類およびビタミン類 (Chu C.C. 1978 Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press, Beijing, pp. 43-50) 1g 1カザミン酸、2mg 12,4-D、2g 1グルイト) に移植し、25℃、暗所下で2〜5日間培養した。その後、接種未熟胚を250mg 1セフォキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォキシムを含む2Mβニグ培地で3日〜1週間培養を行った。

(6) αS活性の調査方法

- 共存培養処理後、組織を0.1% Triton X-100を含む

18

- 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0mMプロモモ-4-ククロバクテリウムβ-D-グルコシル糖 (X-gluc) および20%メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織に対する百分率で表した。また、浸漬処理後得られた形質転換組織と考えられるハイグロマイシンあるいはホスフィノシリル抵抗性カルスおよび形質転換植物体のαS活性の判定に際しては、抵抗性カルスおよび植物体の一部を切り取り同様な方法によりαS染色を行った。

(7) 形質転換細胞の選別と植物体平分化

- アグロバクテリウムを接種したトリモロコシ未熟胚を250mg 1セフォキシムおよび0〜100mg 1ハイグロマイシンまたは0〜20mg 1PPTを含むLS1.5カルス増殖培地で約8週間培養し抵抗性のカルスを選別した。この抵抗性カルスを30mg 1ハイグロマイシンまたは0〜20mg 1PPTを含むLS2培地 (LS1.5カルス増殖培地から2,4-Dを除き、50mg 1セフタジンを加えた組成) に置換し、25℃暗所で培養し再分化を行った。

- イネ未熟胚を250mg 1セフォキシムおよび50mg 1ハイグロマイシンを含む2Mβニグ培地で3〜4週間培養し、抵抗性のカルスを選別した。さらに、この抵抗性カルスを100mg 1ハイグロマイシンを含むN6-7培地 (N6無機塩類、N6ビタミン類、2g 1カザミン酸、1mg 12,4-D、0.5mg 16βA、30g 1ソルビトール、20g 1シロ、2g 1グルイト) で2〜3週間培養したのち、50mg 1ハイグロマイシンを含む植物体再生用のN6S3培地 (LS2培地N6主要無機塩類、N6微量無機塩類、N6ビタミン類、1g 1カザミン酸、0.5mg 1NAA、1mg 1カザミン酸、3g 1グルイト) に移植した。なお、培地にはすべて250mg 1セフォキシムを添加した。

- (8) トリモロコシ形質転換世代における導入遺伝子の発現

- LB4404 (pS831) を接種しPPT選抜により得られた形質転換当世代植物を自殖し次世代種子を得た。これらの種子を播種後約2週間目の幼苗から葉片を採取しαS遺伝子の発現を調査した。またこれらの幼苗の葉の一部に50αSに希釈したバスタ (boechs, PPTを主成分とする除草剤) 液を散布し2週間目にPPT抵抗性を調査した。さらに形質転換当世代植物を非形質転換植物 (品種AL88) と交配後約2週間目の未熟胚を採取し10mg 1PPTを含むSD 1.5カルス増殖培地に置換した。25℃、暗所下で3週間培養後カルス形成の有無を指標にPPT抵抗性を調査した。LB4404 (pDK233) を接種しハイグロマイシン選抜により得られた形質転換植物も非形質転換植物 (品種AL88) と交配し、次世代植物の幼苗でαS遺伝子の発現を調査した。

- (9) サザン法による導入遺伝子の分析

19

20

- 菌株LB4404 (pS831) を接種し、PPT選抜により得られた形質転換当世代および次世代のトリモロコシ幼苗から小葉の一方 (Komari et al., 1989; Theor. Appl. Gene 1:77:547-552) に従いDNAを抽出し、抽出したDNAを制限酵素BamHIで処理し、αS遺伝子およびbar遺伝子をプローブとしたサザン法による導入遺伝子の検出を行った。T-DNA内部のBamHI 1サイトからL-ボーター配列の末端までのDNA領域の長さはαS遺伝子で約2.3kb、bar遺伝子で約2.7kbである (図2)。なおサザン法について、T-DNA複製は非常に微細な組織であり、そこで芽出しアグロバクテリウムを感染させることは容易でない。本実験の結果から生長点近傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の切り出し、芽刺などに感染した細胞が必要であると考えられた。

(10) トリモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

- Couldら (Could J. et al., 1991; Plant Physiol. 1:95:426-434) による生長点組織 (茎頂組織) を材料 *

表1 トリモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

供試組織数	生長した植物体数	得られた植物体数	GUS+植物体数
24	9	2	0
26	8	6	0
17	13	5	0
14	1	0	0
45	14	7	0
32	14	8	0
30	7	1	0

供試品種はいずれもP3732

- (11) トリモロコシ未熟胚への接種
トリモロコシ未熟胚を材料として、アグロバクテリウムを処理した場合、供試しない品種でも高率でαS遺伝子の発現がみられた。αS遺伝子の発現部位は肉質ではつきりと確認できる大きさであり、広範囲の組織で遺伝子発現がなされた。また、EHW101 (pIG211m)、LB4404 (pDK232) およびLB4404 (pS831) の関係間でαS遺伝子発現率の差は認められなかった。これらのことからアグロバクテリウムによる形質転換法において、未熟胚は安定して高率の感染を示す適当な材料であると判断される。

表4 ハイグロマイン選抜によるトウモロコシ未熟胚の形質転換効率

実験	ハイグロマイン 選抜経過 (mg l)	ハイグロマイン 抵抗性カルス数	供試未熟胚数 (%)
1	0-30-50	5	22(23)
2	0-30-50	6	22(27)
3	0-30-100	2	19(11)

ハイグロマイン選抜は共存培養後、各濃度で2～3週間ずつ培養した。

表5 ハイグロマイン選抜による形質転換植物体の選抜効率

実験	ハイグロマイン 抵抗性カルス数	植物体 再生カルス数	GUS + 植物体数
1	64	11	5
2	15	8	7
3	20	3	2

表6 PPT 選抜による形質転換効率

実験	供試 未熟胚数	増殖 未熟胚数 (%)	再分化 未熟胚数 (%)	GUS + 植物体数 (%)
1	364	200(55)	71(20)	44(12)
2	121	42(35)	31(26)	20(17)
3	68	28(41)	17(25)	9(13)
4	44	28(64)	9(20)	6(14)

各欄の未熟胚数および植物体数はクロロンを含まない数

表7 再分化培地中へのPPT 添加が再分化効率および形質転換効率に及ぼす影響

PPT 添加	供試 カルス数	再分化 カルス数 (%)	再分化植物体のGUS染色率 (%)		
			GUS-	キメラ	GUS-
+	714	335(47)	74	17	9
-	350	184(53)	40	33	27

PPT添加濃度 + : 20 mg l, - : 0 mg l

(15) トウモロコシ形質転換当代における導入遺伝子のサザン解析

形質転換体の全DNAをBamHIで切断した断片に対してba
rおよびGUS遺伝子をプローブとしたサザン法により形質
転換当代における導入遺伝子の検出を行った。いずれの
遺伝子をプローブとした場合でも供試した全ての個体で
1～数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表
8)。プラスミドpS8131の中ではbar遺伝子を含むBamHI
断片は2.7kb, GUS遺伝子を含む同断片は2.3kbであるの

に対し供試した全ての形質転換体には約3kb以上のバン
ドが認められた。このことはbar, GUSの両遺伝子とも植
物体染色体に組み込まれたことを示しているものである。ま
た検出されたDNA断片の長さは由来の送り遺伝子では全て
異なっていた。これはトウモロコシの染色体への送り遺伝子導入
箇所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内
でのバクテリアの残存によるものではないことが確認さ
れた。

表8 サザン解析による形質転換当代における
導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (当代)	導入遺伝子コピー数	
	b a r	G U S
対照	-	-
転換体 1	2	2
2 a	2	1
2 b	2	1
3	2	1
4 a	2	1
4 b	2	1
5	2	2
6	3	1
7	2	1
8	2	2
9 a	1	1
9 b	1	1
10	1	1

(15) p10233を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現と分析
と非形質転換植物を交配して得られた次世代植物の葉をQAS染色したところQAS陽性と陰性の比は、ほぼ1:1に分離し予想された分離比に適合した(表9)。

表9 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ
形質転換個体の次世代における導入遺伝子の発現

形質転換個体	次世代個体数	
	G U S 発現	
対照 転換体 1 1 2	陽性	陰性
	0	5
	4	5
	5	6

(17) p5831を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現
対照品種の葉をQAS染色したところ全て陰性であったのに対し、形質転換植物を自殖して得られた次世代の葉は1個体を除き全て陽性を示した。さらにこれらの植物体にバスタを塗布したところ対照品種の葉は約2週間で全て枯死したが形質転換次世代の葉はQAS陽性を示した個体を除き全て健全であった(表10)。QAS遺伝子の発現、PT低抗性ともに2因子分離に適合する遺伝的分離を示した。次に対照品種より採取した未熟胚をPT含有培地で培養したところ全ての未熟胚が増殖を抑制されカ

表10 PPT選抜によるトウモロコシ形質転換個体の次世代における

導入遺伝子の発現（幼苗での検定）

形質転換個体	次世代個体数			
	コピー数		PPT抵抗性	
	bar	GUS	抵抗性	GUS
対照	-	-	0	50
転換体21	2	2	49	1

表11 PPT選抜によるトウモロコシ形質転換個体の

次世代における導入遺伝子の発現（未熟胚による検定）

形質転換個体	次世代未熟胚数		
	PPT抵抗性		
	抵抗性	感受性	
対照	0	76	
転換体31	29	32	
32	22	25	

(18) p501.01を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子のサザン解析
表10に示した形質転換個体No. 21を自殖して得られた次世代植物からDNAを抽出し同様の方法でサザン法による導入遺伝子の検出を行った。植物体でのGUS遺伝子の発現が陽性、PPT感受性であった個体を除き、全ての個体でいずれの遺伝子もプロンプとした場合でも導

表12 サザン解析による形質転換次世代における

導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (次代)	導入遺伝子コピー数	
	bar	GUS
対照	-	-
21-1	1	1
-2	2	2
-3	1	1
-4	1	1
-5	0	0
-6	1	1
-7	1	1
-8	2	2
-9	1	1
-10	2	2
-11	1	1

(19) イネ未熟胚への接種

トウモロコシ未熟胚を材料としたときと同様に、イネ M404 (pT0G32) を用いた場合に顕著に高い効率であるLB未熟胚においても高率でGUS遺伝子の発現が認められ、* 遺伝子の発現が認められた（表13）。

表13 イネ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

菌系	GUS+の組織数/処理組織数 (%)
無処理	0 / 50 (0)
EHA101(pIG21Hm)	66 / 198 (33)
LB4404(pT0G232)	52 / 52 (100)

この実験で使用した2種類のバイナリーベクターはア 50 グロバクテリウムの細胞の中ではGUS遺伝子は発現しな

37
 いことから、共存培養後のQ5遺伝子を指標とした場合、アグロバクテリウムはトウモロコシおよびイネの細胞に遺伝子を導入できることが確認された。
 (20) イネ形質転換植物体の選抜
 イネ未熟胚において、50mg/lハイグロマイシン添加培地上で低抵抗性カルスの選抜を行ったところ、スーパーハイナリーベクターを有する図系を用いた場合に、顕著に高い効率で低抵抗性カルスが得られた(表14)。これらは、選抜マーカーを含む植物体再生培地に移植することにより、容易に再生植物体が得られた(表14)。また、10株の植物体の葉におけるQ5発現を確認したところ、いす*が本実施例において明らかとなった。

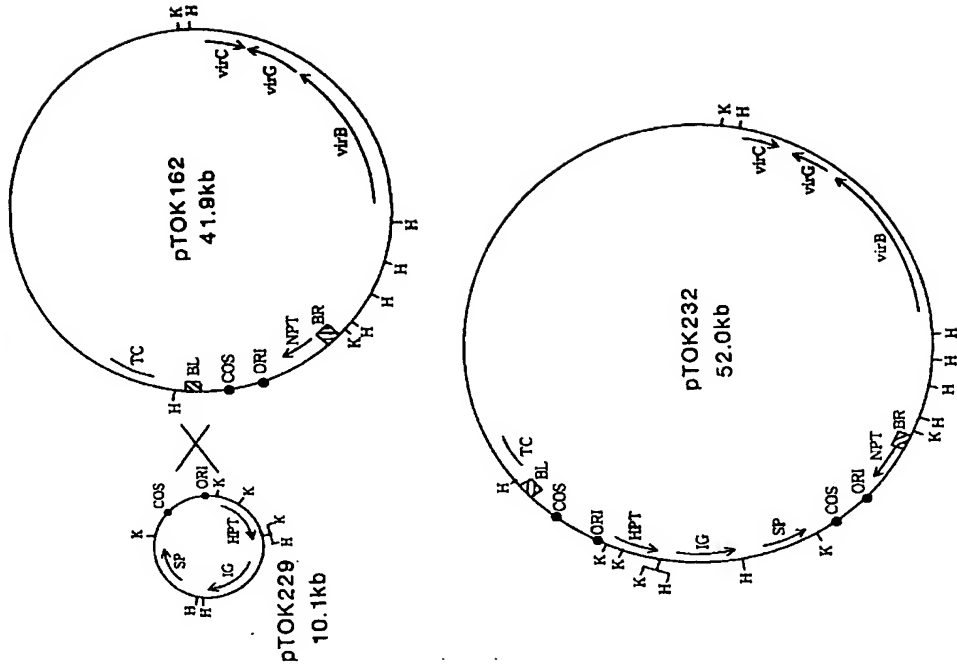
表14 イネ未熟胚における形質転換体の選抜結果

図系	組織数 (%)			選抜薬剤
	供試未熟胚	抵抗性カルス	植物体再生カルス	
無処理	40	0 (0)	0 (0)	HYG
ERA101(pIG121Hm)	71	3 (4)	1 (1)	HYG
LBA4404(pTOK232)	77	23 (30)	17 (22)	HYG

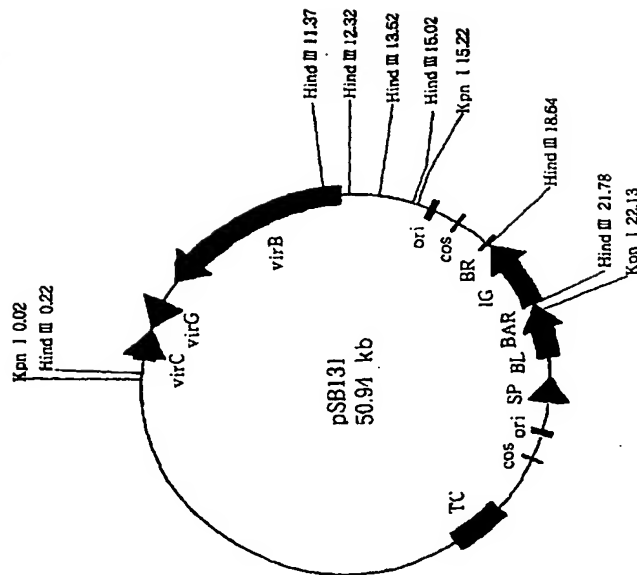
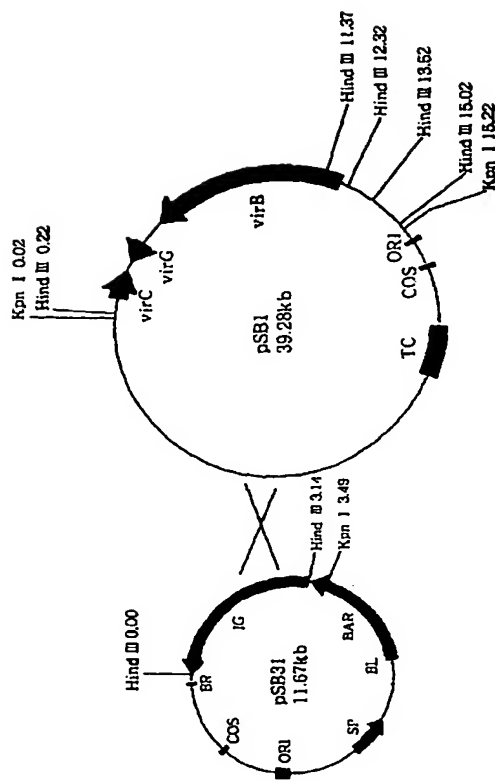
HYG : ハイグロマイシン

(21) イネ形質転換植物体における導入遺伝子の確認
 LBA4404 (pTOK232) をイネ未熟胚に処理することにより得られた任意かつ独立な形質転換植物3個体について、導入遺伝子の存在を確認(PCR法)により行われた。Q5遺伝子およびpTOK232のプライマーには構造領域の両端を用いた。対照として非形質転換体のDNAAおよび各遺伝子を有するプラスミドDNAを用いた。その結果、LBA4404 (pTOK232) を処理することにより得られた形質転換植物で、対照のプラスミドにおけるのと同様に、3個体ともpTOK232の1.1kbの増幅断片が検出された。また、Q5遺伝子についてもすべての個体で対照プラスミドと同様の1.8kbの増幅断片が検出された。非形質転換植物ではこれらの断片は検出されなかったことから、供試植物体はアグロバクテリウムにより導入された遺伝子を有する形質転換植物体であることが確認された。
 産業上の利用可能性
 上述のように、本発明の方法は、従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対してでも普遍的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法であるので、本発明は、有用な性質を有する単子葉植物の育種に利用可能である。

【第1図】



【第2図】



- (56)参考文献 特開 平4-22257 (JP, A)
 Plant Mol. Biol., Vol. 1, No. 3 (1993) p. 491-506
 Plant Cell, Vol. 4, No. 1 (1992) p. 7-16
 Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 25, No. 3 (1990) p. 1495-1505
 Plant Cell, Vol. 4, No. 12 (1992) p. 1495-1505
- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
 A01H 1/00
 C12N 15/84
 BIOSIS/WPI (DIALOG)
 CA (STN)